

Exhibit B

蚕とカブト虫クチクラ由来キチンの精製

羽賀 篤信・張 敏

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所

(1997年10月6日 受理)

日本蚕糸学雑誌

第67巻 第1号 (平成10年2月) 別刷

Reprinted from

THE JOURNAL OF SERICULTURAL SCIENCE OF JAPAN

Volume 67, Number 1 (February 1998)

蚕とカブト虫クチクラ由来キチンの精製

羽賀 篤信・張 敏

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所
(1997年10月6日 受理)

ATSUNORU HAGA and MIN ZHANG: Preparation of chitin from cuticle of silkworm and beetle

Chitin was isolated from exuvia of silkworm pupae or from cuticle of beetle larvae by treatment with 1 N HCl at 100°C for 20 minutes, then with aqueous 1 N NaOH at 80°C for 36 hours. Of which, the chemical structure was characterized by FT-IR, ¹³C CP/MAS NMR, ¹³C NMR and elemental analysis. The analytical results of HPLC for the acid-solution treated by 1 N HCl showed the present of diphenol [DL-β-(3,4-dihydroxyphenol) α-alanine, norepinephrine, catechol et al.], and that is one of primarily component of cuticle of silkworm and beetle. (National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwashi 1-2 Tsukuba, Ibaraki 305-8634)

Key words: cuticle of silkworm and beetle, isolate, diphenol, chitin, chitosan

緒 言

キチンはN-アセチル-β-D-グルコサミン残基の(1→4)結合した直鎖型の生体高分子(ホモアミノ多糖)で、昆虫の表皮、カニやエビの甲殻、カビ、キノコなどの真菌類の細胞壁、イカなどの軟体動物の骨格など自然界に広く分布している。キトサンは遊離アミノ基の置換度と分布を異にするキチンのN-脱アセチル化物である。キチン、キトサンは明確な化学構造を持ち、化学反応性に富むアミノ基と水酸基が存在するので、これら基の化学修飾(MIN ZHANG, et al., 1997)によりゲル化(MIN ZHANG, et al., 1994)、抗血栓作用(平野, 1992)、創傷治癒促進(大浦, 皆川, 1992)、血適合性(HIRANO, S., Noishiki, Y., 1985)、硫酸化誘導体の抗凝血作用(Hirano, S. et al. 1985)など新しい分子機能や生物機能を示す天然高分子として注目され、未利用の天然資源として工業的利用面への関心が持たれ、様々な分野で活発な研究が行われている。しかし、キチン、キトサンに関する研究はほとんどがカニ殻、エビ殻由来キチンを用いたものである。近年、甲殻類のα型キチンと結晶構造が異なるβ型キチンを

含んでいるイカ由来キチンについての研究も始められたが(E. OHASHI, et al., 1990)、昆虫の生理現象である脱皮に重要な役割を果たしている昆虫由来キチンについての研究は非常に少ない。我々は昆虫由来キチン及びその誘導体の特異性を利用した機能性生体素材の開発を目的として、蚕の蛹脱皮殻並びにカブト虫幼虫のクチクラからキチンを調製する方法を検討した。また、キチン及びN-脱アセチル化されたキトサンの化学構造は¹³C NMRスペクトル、FT-IRスペクトル、元素分析により調べた。昆虫クチクラに主な成分として存在するdiphenol類は、HPLC、UV、¹³C CP/MAS NMRにより分析を行った。

本研究で材料の提供を受けた蚕糸・昆虫農業技術研究所の方々及びご助言をいただいた鳥取大学農学部平野茂博教授と蚕糸研機能開発部物性評価研究室の山田弘生COE特別研究員、また本論文のご校閲をいただいた機能開発部長西出照雄博士に謝意を表します。

材料と方法

1. 実験材料

キチンの調製には蚕の蛹脱皮殻、カブト虫幼虫のクチクラ、エビ殻を用いた。各材料は水で洗浄、真

空乾燥した後に粉碎し、125メッシュのふるいにかけて通過した微粉末を用いた。

2. 分析方法

試料は2% acetic acid- d_4 溶液とし、JEOL 鋼 α -400 を用いて、 ^{13}C 溶液 NMR を測定した。一方、固体 ^{13}C NMR CP/MAS スペクトルは Chemagetics CMX-300 を用いて、測定した。キチン、キトサンの ^{13}C シグナルの帰属は、*N*-アセチル-D-グルコサミンの帰属 (ZHANG, M., HIRANO S., 1995) に従った。FT-IR スペクトルの測定は Jasco 8900 を用いた。また、旋光度はデジタルポラリメーター (Jasco DIP-1000) を用いて測定した。粘度の測定はビスクメーター (AND CJv 5000 Vibro) を用い、有機化合物 diphenol 類分析は高圧液相クロマトグラフ (島津製作所製の LC-10 A) を用いた。元素分析は九州大学理学部に依頼し、*N*-アセチルの換換度は C/N 比により換算した。

3. キチンの調製

蚕の蛹脱皮殻を流水下で洗浄して付着物を丁寧に除去し、真空で乾燥した。冷凍保存しておいたカブト虫幼虫は内容物を除去して、表皮を流水で洗浄し、真空乾燥した。乾燥した蛹脱皮殻 5g を 1N HCl 溶液 300 ml に入れ、窒素ガスを充満した環境下で、100°C、20 分の処理を行い、温水、蒸留水により蛹脱皮殻を中性になるまで洗浄、真空乾燥した。次に真空乾燥した蛹脱皮殻を 1N NaOH 溶液 300 ml に浸漬し、80°C で 36 時間攪拌しながら蛹脱皮殻のタンパク質を除去した。なお、タンパク質除去の途中 2 回新しい 1N NaOH 溶液に交換した。処理した蚕の蛹脱皮殻は温水、蒸留水により中性になるまで洗浄を繰り返し、真空乾燥した。少量残存しているタンパク質を完全に除去するため、0.4% Na_2CO_3 溶液で 80°C で 6 時間処理した。また、乾燥されたカブト虫幼虫のクチクラからのキチンも同様な方法で取り出した。

1N HCl で処理した溶液を HPLC で、キチンは FT-IR, ^{13}C CP/MAS NMR で分析した。

4. キトサンの調製

3. の方法で調製した蚕の蛹脱皮殻由来キチン 3g に 35% NaOH 溶液 200 ml を加えて、4°C で 3 時間真空吸引し、その溶液の NaOH の濃度が 40% になるまで NaOH を添加した。攪拌しながら、キチン重量の 7% の水素化ホウ素ナトリウムを加え、窒素

ガスを充満した環境下で、110°C で 4 時間 *N*-脱アセチル化をした。回収したキトサンは室温にて 2% 酢酸に溶解させ、遠心分離 (3000×g, 20 min) で少量の不溶物を除き、上澄液は pH 10 に達するまで、1N NaOH 溶液を滴下し、キトサンを沈殿させ、精製を行った。FT-IR, ^{13}C NMR, 元素分析でこのキトサンの化学構造を解析し、旋光度、溶解度などの物性を調べた。

5. キチンの酸加水分解

3. の方法で得られた蚕蛹脱皮殻由来キチンを粉碎し、125メッシュを通過した粉末のキチン 0.3g を、6N HCl 溶液 50 ml に添加して、110°C の油浴で 20 時間回流した。濾液は活性炭で脱色した後、減圧濃縮した。D-glucosamine-HCl の結晶を収集した後、アルコールで再結晶させ、 ^1H NMR, ^{13}C NMR で D-glucosamine-HCl の化学構造を分析した。

結果と考察

1. キチンの調製

従来、昆虫クチクラの主成分はタンパク質、キチン、脂質、水分と言われている。近年、Kramer らのグループにより、タバコスズメのクチクラ硬化に関する研究が行われ、クチクラ中に上述以外の成分 diphenol 類が存在することが認められている (K. J. KRAMER, et al. 1984)。しかし、昆虫のクチクラからのキチンの単離例は非常に少ない。我々の研究において、蚕の蛹脱皮殻とカブト虫幼虫のクチクラを用いて、1N HCl で diphenol 類を抽出し、1N NaOH でタンパク質を取り除いた後、昆虫由来のキチンが単離された。タンパク質除去に用いた 1N NaOH 溶液の UV 吸収は、エビ殻を処理した残液の UV 吸収と同じであった。昆虫クチクラ中に含まれる蛋白質分析結果については既に多く発表があるため (JUDITH H. WILLIS, 1987)、本研究ではタンパク質の分析は行わなかった。

1N HCl で抽出した残液は HPLC の分析により catechol, norepinephrine, DL- β -(3,4-Di-hydroxyphenyl) α -alanine などの diphenol 類が存在することが分かった。甲殻類の殻は、キチンとカルシウムを主体とする灰分とタンパク質により構成されているのに対し、昆虫のクチクラには灰分が殆ど存在せず、タンパク質、diphenol 類、キチンで構成されていることが分かった。Table 1 に示すように、蚕の蛹脱皮殻中にはタンパク質が 62~67%、diphenol 類が 15~20%、脂質が 1~2%、キチンが 15~18% 含

Table 1 Compositions of Insect Cuticle

Compositions	Exuvia of silkworm pupae				Cuticle of beetle larvae			
	Protein	Chitin	Diphenol	Lipid	Protein	Chitin	Diphenol	Lipid
1N NaOH 80°C 36h	62-67%				40-50%			
1N HCl R.T 20h			5%				15%	
1N HCl 100°C 20min			15%				20-25%	
CHCl ₃ -MeOH (2:1 V/V)				1%				5%
		15-18%				20-30%		

まれている。また、カブト虫幼虫のクチクラにはタンパク質を40~50%, diphenol類を20~25%, 脂質を5%, キチンを20~30%含んでいる。

特に、NaOH中で室温に蚕の蛹脱皮殻から抽出したタンパク質は40%程度であるが、加熱して抽出すると62~67%が抽出された。これは蛹脱皮殻の外層部分に蛋白質と結合している色素メラニンが熱アルカリに良く溶解するので、蛹脱皮殻の内層部分のタンパク質が溶出しやすいためと考えられる。また、室温で処理時間を長くすることによっても、タンパク質を抽出することができるが、色素メラニンを除去することができない。また、アルコール、ピリジン、クロロホルムなど有機溶媒でも色素が抽出できないことが分かった。また、加熱しすぎると色素はよく除去できるがこの時低分子化と脱アセチル化が進行したため、キチンの収量は減少する。

1N HClで抽出した溶液をHPLC分析した結果、溶出した成分は5.09分後に catechol, 5.47分後に norepinephrine, 8.95分後に DL- β -(3,4-Dihydroxyphenyl)- α -alanine, 20.14分後に 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-methyl-L-alanine が出現することを確認した (Fig. 1)。また、熱水中で DL- β -(3,4-dihydroxyphenyl)- α -alanine は抽出でき、norepinephrine は HCl ではないと抽出できないことを確認した。カブト虫幼虫のクチクラには、catechol, norepinephrine がかなり多量に含まれている。また、1N HClで室温にて20時間処理すると蚕の蛹脱皮殻、カブト虫幼虫のクチクラにそれぞれ5%, 15%の diphenol類が抽出された。一方、100°C, 20分で処理すると蚕の蛹脱皮殻、カブト虫幼虫のクチクラにそれぞれ15%, 20-25%の diphenol類が抽出され、処理温度・時間などの条件によって、diphenol類の抽出量の異なることが確認できた。また、1N HClで100°C, 1時間以上処理するとかなりキチンの収率が低下し、蚕の蛹脱皮殻、カブト虫幼虫のクチクラは甲殻類キチンよりも低分子化されや

すいと考えられる。

FT-IR スペクトル [ν_{\max} (KBr) cm^{-1}]: 3444 (OH), 2932 (COCH₃), 2891 (CH), 1659-1625 (C=O of *N*-acetyl), 1559 (NH of *N*-acetyl)], ¹³C CP/MAS NMR スペクトルにより精製したキチンの化学構造を明らかにした。Fig. 2の

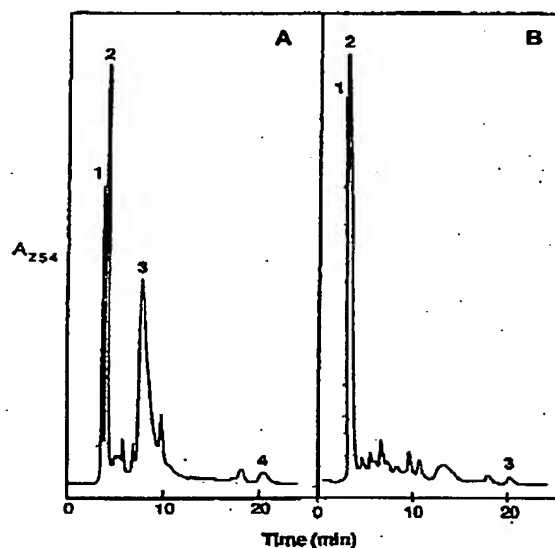


Fig. 1 HPLC patterns for the acid-solution of cuticle of silkworm pupae (A) and beetle (B) treated by 1N HCl at 100°C, 20 min. Condition: Column: ODP-50 6D Mobile phase: 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5) Temperature: 40°C Flow rate: 0.5 ml/min Detector: UV (254 nm) Peaks of A: 1, catechol; 2, norepinephrine; 3, DL- β -(3,4-dihydroxyphenyl)- α -alanine; 4, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-methyl-L-alanine. Peaks of B: 1, catechol; 2, norepinephrine; 3, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-methyl-L-alanine.

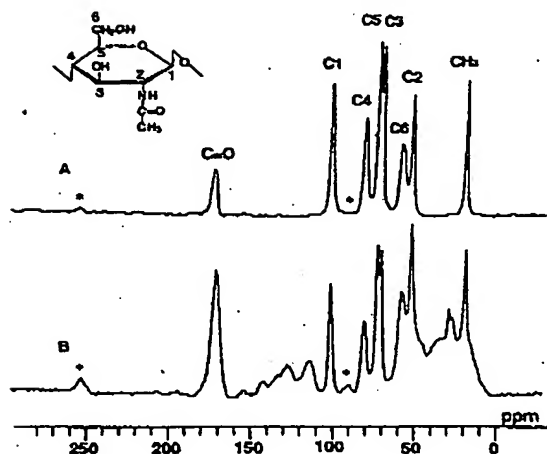


Fig. 2 ^{13}C CP/MAS NMR spectra for the chitin from exuvia of silkworm pupae (A) and exuvia of silkworm pupae (B). * indicates a side band.

蚕の蛹脱皮殻由来キチンのスペクトル (図中A) に示すように、キチンのシグナルは 173.5 (C=O), 104.4 (C1), 83.4 (C4), 75.9 (C5), 73.6 (C3), 61.1 (C6), 55.4 (C2), 23.0 (CH_2) ppm にそれぞれ出現している。カニ殻、エビ殻由来キチンの ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルのシグナルと Fig. 2 の A を比較すると蚕の蛹脱皮殻由来キチンの C3 シグナルは高磁場側 3 ppm に (ZHANG, M., HIRANO S., 1995) シフトすることが分かった。

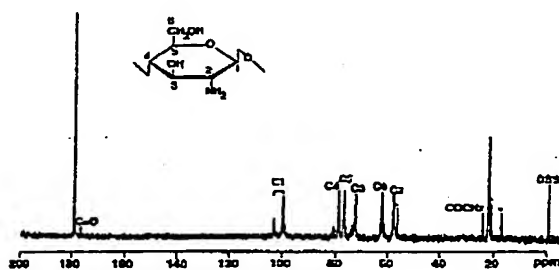


Fig. 3 ^{13}C NMR spectrum of chitosan from exuvia of silkworm pupae in 2% CD_3COOD . Sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane 5-sulfonate (DSS) was used as chemical shift reference. * indicates DSS.

2. キトサンの調製

粉碎された蚕の蛹脱皮殻由来キチンの脱アセチル化は、40% NaOH 溶液に 110°C で 4 時間行った。回収したキトサンの ^{13}C NMR (2% acetic acid- d_4) スペクトルは (Fig. 3), 103.9, 100.4 (C1), 81.3, 79.5 (C4), 77.4 (C5), 72.8 (C3), 62.8 (C6), 58.5 (C2) ppm にそれぞれ出現している。キチンの *N*-脱アセチル化度は、 ^{13}C NMR スペクトルと元素分析 C/N 比により換算した (Calc. for $\{\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4\text{N}\}_n$ ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}\}_{0.55}(\text{H})_{0.45}\cdot 0.24 \text{H}_2\text{O}$) $_n$: C:44.95; H:6.72; N:7.60, Found: C:44.72; H:7.12; N:7.53.)。精製したキトサンの旋光度は $[\alpha]_D^{25} = -22^\circ$ (0.2, 2% acetic acid) で、粘度は $\eta_{327} \text{ cps}$ (23°C , 2% acetic acid) である。FT-IR スペクトルは ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3446 (OH), 2883 (CH), 1602 (NH_2) であり、カニ殻、エビ殻由来のキトサンの吸収とほぼ同じである。

3. キチンの酸加水分解

蚕の蛹脱皮殻由来キチンとエビ由来キチンの酸加水分解を行った。6 N HCl を用いて完全に D-glucosamine-HCl になるまでの加水分解時間はエビ殻では、33 時間、蚕の蛹脱皮殻では 20 時間を要した。精製を反復して再結晶した D-glucosamine-HCl の ^{13}C NMR (D_2O) スペクトルでは、95.4, 91.8 (C1), 78.8, 74.3 (C5), 74.7, 72.3 (C3), 72.4, 72.3 (C4), 63.1, 63.0 (C6), 59.4, 57.0 (C2) ppm にそれぞれ炭素のピークが現れており、カニ殻、エビ殻キチンの酸加水分解物の ^{13}C シグナル及び *N*-アセチル-D-グルコサミンの ^{13}C シグナルの帰属と一致する (ZHANG, M., HIRANO S., 1995)。

摘 要

蚕の蛹脱皮殻とカブト虫幼虫のクチクラに 1 N HCl を加え、 100°C で 20 分間処理をして、diphenol 類を除去した後、1 N NaOH を加え、 80°C , 36 時間をかけて、タンパク質の除去を行い、昆虫由来キチンを得た。さらに 40% NaOH 溶液中で、 110°C , 4 時間加熱してキチンの *N*-脱アセチル化を行い、キトサンを精製した。キチン及びキトサンの化学構造を ^{13}C FT-NMR, ^{13}C CP/MAS NMR スペクトル, FT-IR スペクトル, 元素分析により明らかにした。また、HPLC, UV, ^{13}C CP/MAS NMR の分析結果から、昆虫クチクラの主成分として norcypinephrine, DL- β -(3,4-dihydroxyphenyl) α -alanine などの diphenol 類であることを確認した。蚕の蛹脱

皮殻にはタンパク質が62~67%, diphenol類が15~20%, 脂質が1~2%, キチンが15~18%含まれており, カブト虫幼虫クチャラにはタンパク質が40~50%, diphenol類が20~25%, 脂質が5%, キチンが20~30%が含まれていることを明らかにした。

文 献

- MIN ZHANG, HIROSHI INUI, and SHIGEHIRO HIRANO (1997): A Facile Method the preparation of 6-Deoxy Derivatives of Chitin. *J. Carbohydrate Chemistry*, 16, 673-679.
- MIN ZHANG, EUGENE KOHR and SHIGEHIRO HIRANO (1994): Hydrogels of Chitin and Chitosan. *Food Hydrocolloids: Structures, Properties, and Functions*, 65-70.
- 平野茂博 (1992): 腎臓, 5, 94-99.
- 大浦武彦, 皆川英彦 (1992): 西日皮膚, 54, 998.
- HIRANO, S., NOISHIKI, Y. (1985): The blood compability *N*-acylchitosans. *J. Biomed. Mater. Res.*, 19, 413-417.
- HIRANO, S., TANAKA, Y., HASEGAWA, M., TOBETTO, K., NISHIOKA, A. (1985): Effect of sulfated derivatives of chitosan on some blood coagulation factors. *Carbohydr. Res.*, 137, 205-215.
- E. OHASHI, T. KORIYAMA, and T. FUJIA (1990): The Int. Symp. on Chitin Derivative in Life Science. Abstr., Sapporo, Japan, 42.
- K. J. KRAMER, T. D. MORGAN, T. L. HOPKINS, C. R. ROSELAND, Y. ASO, R. W. BEEMAN, and G. L. LOOKHART (1984): Roles In Cuticle Sclerotization and Melanization. *Insect Biochem.* 14(3), 293-298.
- JUDITH H. WILLIS (1987): Cuticular Proteins: The Neglected Component. *Arch Insect Biochem Physiol*, 6, 203-215.
- ZHANG, M., and HIRANO S. (1995): Novel *N*-unsaturated fatty acyl and *N*-trimethylacetyl derivatives of chitosan. *Carbohydr. Polym.*, 26, 205-209.